

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

---

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-322846

(43)公開日 平成5年(1993)12月7日

(51)Int. CL <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447				
B 0 1 D 57/02				
C 0 7 K 3/14		7731-4H		
G 0 1 N 33/92		Z 7055-2J		
		7235-2J		
			G 0 1 N 27/ 26	3 1 5 Z
			審査請求 有	請求項の数43(全 10 頁)

(21)出願番号 特願平4-163337

(22)出願日 平成4年(1992)6月1日

(31)優先権主張番号 708, 272

(32)優先日 1991年5月31日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591028256

ベックマン インストルメンツ インコー  
ポレーテッドBECKMAN INSTRUMENT  
S. INCORPORATEDアメリカ合衆国 92634 カリフォルニア  
州 フラートン ハーバー ボルバード  
2500

(72)発明者 フータイ エイ チェン

アメリカ合衆国 92621 カリフォルニア  
州 プリー エス クリスタル スプリン  
グス 105

(74)代理人 弁理士 松永 宣行

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 毛管電気泳動を利用する試料の分析

(57)【要約】

【目的】 毛管ゾーン電気泳動による糖蛋白質を含む試  
料の分析に有用な方法及び電解質緩衝剤を提供する。【構成】 緩衝剤は分析すべき糖蛋白質の糖部分と錯体  
形成することができる少なくとも1つの試薬を含んでな  
り、さらに好ましくはpH調節剤を含む。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖蛋白質の糖部分と錯体形成することができる少なくとも1つの試薬を含んでなる糖蛋白質成分の毛管ゲル電気泳動分離用緩衝剤。

【請求項2】 前記錯体形成試薬がホウ酸、炭素原子数約1から約20のアルキル部分を有するホウ酸アルキル、リン酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸ルビジウム、リン酸セシウム、リン酸フランシウム、炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ルビジウム、炭酸セシウム、炭酸フランシウム、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムからなる群から選ばれる請求項1記載の緩衝剤。

【請求項3】 前記ホウ酸アルキルが炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有している請求項2記載の緩衝剤。

【請求項4】 前記ホウ酸アルキルが炭素原子数1のアルキル部分を有している請求項2記載の緩衝剤。

【請求項5】 前記モノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウムの少なくとも1つのアルキル基が炭素原子数約1から約3を有している請求項2記載の緩衝剤。

【請求項6】 前記モノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムの少なくとも1つのアルキル基が炭素原子数約1から約3を有している請求項2記載の緩衝剤。

【請求項7】 前記緩衝剤中の前記錯体形成試薬の濃度が試料の糖蛋白質に対し化学量論的過剰である請求項1記載の緩衝剤。

【請求項8】 前記緩衝剤中の前記錯体形成試薬の濃度が約20mMより大きいものである請求項1記載の緩衝剤。

【請求項9】 前記錯体形成試薬がホウ酸である請求項1記載の緩衝剤。

【請求項10】 前記緩衝剤中の前記ホウ酸の濃度が約70mMと約400mMの間にある請求項9記載の緩衝剤。

【請求項11】 前記緩衝剤中の前記ホウ酸の濃度が約75mMと約250mMの間にある請求項9記載の緩衝剤。

【請求項12】 前記緩衝剤中の前記ホウ酸の濃度が約80mMである請求項9記載の緩衝剤。

【請求項13】 さらに少なくとも1つのpH調節剤を有効量含んでなる請求項1記載の緩衝剤。

【請求項14】 前記pH調節剤が水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ルビジウム、水酸化セシウム、水酸化フランシウム、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリ

ー、及びテトラールアルキル水酸化アンモニウムからなる群から選ばれる請求項13記載の緩衝剤。

【請求項15】 前記モノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル水酸化アンモニウムの少なくとも1つのアルキル基が炭素原子数約1から約3を有する請求項14記載の緩衝剤。

【請求項16】 前記pH調節剤が水酸化ナトリウムである請求項13記載の緩衝剤。

【請求項17】 前記緩衝剤のpHが少なくとも約8.00である請求項1記載の緩衝剤。

【請求項18】 糖蛋白質を含有する臨床試料成分の毛管ゾーン電気泳動分離に用いられる緩衝剤であって、

a) 糖蛋白質の糖部分と錯体形成することができる少なくとも1つの試薬、及び

b) 少なくとも1つのpH調節剤

を含んでなり、少なくとも約8.00のpHを有する緩衝剤。

【請求項19】 前記錯体形成試薬がホウ酸、炭素原子数約1から約20のアルキル部分を有するホウ酸アルキル、リン酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸ルビジウム、リン酸セシウム、リン酸フランシウム、炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ルビジウム、炭酸セシウム、炭酸フランシウム、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムからなる群から選ばれる請求項18記載の緩衝剤。

【請求項20】 前記ホウ酸アルキルが炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有している請求項19記載の緩衝剤。

【請求項21】 前記ホウ酸アルキルが炭素原子数1のアルキル部分を有している請求項19記載の緩衝剤。

【請求項22】 前記モノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウムの少なくとも1つのアルキル基が炭素原子数約1から約3を有している請求項19記載の緩衝剤。

【請求項23】 前記モノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムの少なくとも1つのアルキル基が炭素原子数約1から約3を有している請求項19記載の緩衝剤。

【請求項24】 前記緩衝剤中の前記錯体形成試薬の濃度が試料の糖蛋白質に対し化学量論的過剰である請求項18記載の緩衝剤。

【請求項25】 前記緩衝剤中の前記錯体形成試薬の濃度が約20mMより大きいものである請求項18記載の緩衝剤。

【請求項26】 前記錯体形成試薬がホウ酸である請求項18記載の緩衝剤。

【請求項27】 前記緩衝剤中の前記ホウ酸の濃度が約7

0 mMと約4 0 0 mMの間にある請求項2 6記載の緩衝剤。

【請求項2 8】前記p H調節剤が水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ルビシウム、水酸化セシウム、水酸化フランシウム、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル水酸化アンモニウムからなる群から選ばれる請求項1 8記載の緩衝剤。

【請求項2 9】前記モノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル水酸化アンモニウムの少なくとも1つのアルキル基が炭素原子数約1から約3を有する請求項2 8記載の緩衝剤。

【請求項3 0】前記p H調節剤が水酸化ナトリウムである請求項1 8記載の緩衝剤。

【請求項3 1】前記緩衝剤のp Hが約9. 0と約1 2. 0の間にある請求項1 8記載の緩衝剤。

【請求項3 2】分離すべきタンパク質成分を含む試料の毛管ゾーン電気泳動分析法であって、

a) 前記試料をタンパク質の錯部分と錯体形成することができると少なくとも1つの試薬を含んでなる電解質緩衝剤を含有する未処理毛管中に導入し、

b) 前記試料を毛管ゾーン電気泳動処理に付し、そして

c) 前記試料のタンパク質を検出する

段階を有してなる方法。

【請求項3 3】前記錯体形成試薬がホウ酸、炭素原子数約1から約2 0のアルキル部分を有するホウ酸アルキル、リン酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸ルビシウム、リン酸セシウム、リン酸フランシウム、炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ルビシウム、炭酸セシウム、炭酸フランシウム、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムからなる群から選ばれる請求項3 2記載の方法。

【請求項3 4】前記緩衝剤中の前記錯体形成試薬の濃度が試料の糖タンパク質に対し化学量論的過剰である請求項3 2記載の方法。

【請求項3 5】前記緩衝剤中の前記錯体形成試薬の濃度が約2 0 mMより大きいものである請求項3 2記載の方法。

【請求項3 6】前記錯体形成試薬がホウ酸である請求項3 2記載の方法。

【請求項3 7】前記緩衝剤中の前記ホウ酸の濃度が約7 0 mMと約4 0 0 mMの間にある請求項3 6記載の方法。

【請求項3 8】前記緩衝剤のp Hが少なくとも約8. 0 0である請求項3 2記載の方法。

【請求項3 9】前記緩衝剤がさらに少なくとも1つのp H調節剤を有効量含んでなる請求項3 2記載の方法。

【請求項4 0】前記p H調節剤が水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ルビシウム、水酸化セシウム、水酸化フランシウム、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル水酸化アンモニウムからなる群から選ばれる請求項3 9記載の緩衝剤。

【請求項4 1】前記p H調節剤が水酸化ナトリウムである請求項3 9記載の方法。

【請求項4 2】前記緩衝剤のp Hが約9. 0と約1 2. 0の間である請求項3 2記載の方法。

【請求項4 3】前記試料が全血液、血清、血漿、尿及び脳脊髄液からなる群から選ばれる請求項3 2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】本発明は一般的に試料の分析、特に毛管ゾーン電気泳動による分析に関し、さらに詳しくは開放毛管ゾーン電気泳動に用いられる電解質緩衝剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】この項において述べる文献はそれぞれここに本発明を説明するために用いられるものである。哺乳類タンパク質、例えば、全血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿などの臨床試料から誘導されるタンパク質は疾病の状態ないし体調を指示するものとして有用である。これらタンパク質の量及び種類は患者の健康状態の情報を提示することができる。

【0 0 0 3】例えば、血清のタンパク質成分にはアルブミン、アルファ<sub>1</sub>-リボ蛋白質、アルファ<sub>2</sub>-マクログロブリン、ベータ<sub>1</sub>-リボ蛋白質及び免疫グロブリン（ガンマグロブリンを含む）が含まれる。血清の主要なタンパク質であるアルブミンは通常4. 0～5. 0 g/d lの濃度で存在する。アルブミン濃度の低下は腎臓の疾病を指示するものであり、アルブミン濃度の上昇は脱水症の特徴である。アルファ<sub>1</sub>-リボ蛋白質が高いレベルにあることは慢性アルコール中毒もしくは例えば妊娠による過エストロゲン血症を指示するものである。ベータ<sub>1</sub>-リボ蛋白質が高いレベルにあることはコレステロールレベルの上昇を指示するものである。

【0 0 0 4】哺乳類タンパク質はカチオン部分とアニオン部分の両方を含む荷電タンパク質類である。そのためそれら自体は毛管ゾーン電気泳動（CZE）によって分析できるようにしている。CZEは荷電物質を迅速かつ有効に分離することができる技術である。一般的に、CZEには試料を毛管、すなわち、約1 0から約2 0 0 0ミクロンの内径をもつ管に導入すること及び毛管への電場の適用が含まれる。電場の電位は試料を管中で押しやるとともに、試料をその組成部分に分離する。すなわち、試料成分はそれぞれ固有の電気泳動度をもっており、大きい泳動度をもつ成分は低速泳動度をもつものより毛管中

を早く移動する。その結果、試料成分は管中の試料移動中に毛管中で不連続のゾーンに分けられる。その分離を連続的に監視し、分離ゾーンに基いた種々の成分データを求めるのにオンライン検出器を用いることができる。

【0005】CZEは通常毛管カラムの内容物に垂いて2つのカテゴリーに分けられる。そのうち「ゲル」CZEにおいては、毛管は適当なゲル、例えばポリアクリルアミドゲルが充填される。試料中の成分の分離はゲルマトリックス中を移動する成分のサイズ及び電荷によってある程度予測される。「開放」(open)CZEにおいては、毛管は電気伝導性緩衝剤溶液で充填される。毛管のイオン化により負に荷電した毛管壁は緩衝剤からの正イオンの層を引きつける。これらのイオンは電位の影響下で陰極の方向へ流れるのでバルク溶液(すなわち、緩衝剤溶液及び分析される試料)は電気的中性を保つためにこの方向に流れざるをえない。この電気浸透流は電荷に関係なく中性及びイオン性の種を陰極方向へ送る一定の速度成分を与える。開放CZE中の緩衝剤は伝導及び拡散に対してゲルCZE中で用いられるゲル同様に安定である。したがって、開放CZEではゲルに基く電気泳動で得られるのと全く同様の分離が得られる。

【0006】溶融シリカが主として毛管の素材として用いられるが、これはそれがCZEに用いられる比較的高い電圧に耐えられることとその内部壁がイオン化して目的の電気浸透流をもたらす負電荷を生成するからである。しかしながら、毛管の内壁のイオン化は蛋白質の分離に関して問題を発生させる。これは蛋白質が不均一多価電解質(すなわち、その分子自体の電荷が中性である時分子内の正及び負に荷電した部分がほぼ同数である)からである。したがって蛋白質種はイオン化した時その蛋白質種を内壁に強く吸着させるような正味の正電荷分布を持つことできる。この吸着はCZE中に人工的なゾーンの拡大をもたらす、不確定な、誤差の多い、不可解な結果を示すことになる。

【0007】この問題を解決するのに提案された1つの試みは、電圧が作用した時に電気浸透流を低減させるように毛管の内壁を処理、すなわち塗布することであった。換言すれば管上への蛋白質の吸着を減少させることであった。グリコール変性された溶融シリカ毛管が血清蛋白質分析に使用されたが、限定された成功しか得られなかった。ヨルゲンソン・ジェー・ダリユー及びルカス・ケー・ディー「毛管ゾーン電気泳動」(Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. "Capillary Zone Electrophoresis" サイエンス (Science) 222: 266-272 (1983) 参照。これは処理された溶融シリカ毛管の耐用寿命が比較的短く、その塗布物が予測されない様式で「溶解」する傾向があることによる。予測できないという事態は多量の試料を回数多く分析する場合には受け入れられないことである。

【0008】この問題の解決に提案されたもう1つの方

法は、試料の蛋白質成分の等電点(pI)よりも高いpHを有する緩衝剤を使用することであった。周知のように、pHがpIと同じであれば分子の正電荷部分は平衡している。同様に、pHがpIより高いと負電荷部分が優勢になり、pHがpIより低いと正電荷部分が負電荷部分をこえる。例えば、アルブミンのpIは4.6であり、それゆえpH4.6においてアルブミンの正電荷部分と負電荷部分は等しく、全体の電荷は中性である。しかし、pHが等電点よりも高くなると負電荷部分が優勢になり全体の電荷は負になる。かくして高pH緩衝剤の影響下では試料のすべての蛋白質種が負に荷電した内壁から反発される。換言すればこれはそれらの表面吸着を無効ないし少なくとも大きく減少させる。しかし、pHとpIの差が大きいことは蛋白質の構造変化、または加水分解の原因となる。未処理溶融シリカ毛管中で8~11の範囲のpHを有する緩衝剤溶液を用いる蛋白質電気泳動分析の試みはすべての試料ゾーンの再現性のない移行をもたらす結果となった。ラウエル・エイチ・エイチ及びマクマニギル・ディー「未処理溶融シリカ管での蛋白質の毛管ゾーン電気泳動」(Lauer, H. H. & McManis, D. "Capillary Zone Electrophoresis of Proteins in Untreated Fused Silica Tubing" アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.) 58: 166-169 (1986) 参照。

【0009】蛋白質の未処理溶融毛管壁への吸着は蛋白質中の陽イオン部位と壁のケイ酸塩部分との間のイオン交換相互作用によるものであることが理論化されている。ヨルゲンソン・ジェー・ダブリウ「毛管電気泳動」第13章「電気泳動法の新しい方向」(Jorgenson, J. W. "Capillary Electrophoresis", Chpt. 13, New Direction in Electrophoretic Methods.) ACS Symp. Ser. 335, 1987 (Jorgenson, J. W. & Phillips, M., Eds.) 参照。したがって、蛋白質吸着を減少させるのに高塩含有緩衝剤条件が提案されている。ラウエル・エイチ・エイチ及びマクマニギル・ディー、トレンズ・オブ・アナリティカル・ケミストリー (Lauer, H. H. & McManis, D., Trends Anal. Chem.) 5: 11 (1986) 参照。しかし、緩衝液の塩濃度を増加することは毛管の電気伝導度を高める効果があり、そのため管内部の熱を激しく増大させることになる。温度の上昇は泳動ゾーンを拡散状態にし、ゾーンの分解を減少させる。そのような熱の生成を避けるために毛管に適用する電位を大きく減少させねばならない。しかし、このことは試料の分析に必要な時間を増加させるという好ましくない効果をもっている。

【0010】毛管ゾーン電気泳動はイオン種の分離用として非常に有力な手段であるから、上述したような激しい有害な障害に煩わされない蛋白質及び蛋白質部分(ペプチド)試料のCZE分析法に対する要望が存在する。

【0011】

10

20

30

40

50

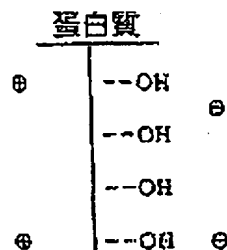
【課題を解決するための手段】本発明はこの要望を、未処理毛管を用いるCZEにおいて臨床試料の分析に有用な緩衝剤を提供することによって満たす。その緩衝剤は糖蛋白質の糖部分と錯体形成することができる少なくとも1つの試薬を含んでなるものである。錯体形成試薬の例としてはホウ酸、例えば炭素原子数約1から約20のアルキル部分を有するホウ酸アルキルのようなホウ酸塩誘導体、リン酸(PO<sub>4</sub>)のアルカリ金属塩、炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウム、炭酸(CO<sub>3</sub>)のアルカリ金属塩、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムが含まれる。

【0012】その緩衝剤には好ましくはpH調節剤が添加される。「pH調節剤」とは緩衝剤のpHを調整するのに用いることができ、錯体形成試薬と相容性があり、かつ好ましくは一価のカチオンを含む試薬を意味する。適当なpH調節剤には水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ルビジウム、水酸化セシウム、水酸化フランシウムなどのアルカリ金属水酸化物、及び炭素原子数約1から約8のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル水酸化アンモニウムが含まれる。緩衝剤のpHは分析される試料の実質的にすべての成分のpIよりも大きい。pH調節剤は少なくとも1つの錯体形成試薬を含んでなる緩衝剤にその緩衝剤のpHが指定のpIよりも高くなるように添加することができる。

【0013】以下に本発明を詳細に説明する。哺乳類分泌蛋白質は非哺乳類分泌蛋白質(例えば、細菌としてE. coli)を用いる組み替えDNA技術によって作られる蛋白質などと違って、主として糖蛋白質、すなわち、その骨格上に糖部分を含有するものである。そのような蛋白質は図式的に次のように示される。

【0014】

【化1】



【0015】記号は蛋白質内に含まれる個々の電荷を示すものである。この電荷分布は、ヘテロ多価電解質と称され、等電点(pI)がpHと等しい時正及び負に荷電した部分が等しくなり、蛋白質全体の電荷は中性であることを示す。pHがpIより高い時蛋白質の電荷分布は全体の電荷が負になるようになる。CZE法は未処理毛管を用い非哺乳類分泌蛋白質の分析に成功して用いられ

てきた。前述の問題が生じるのは哺乳類分泌蛋白質の場合のみである。これは非哺乳類分泌蛋白質は糖蛋白質ではないから哺乳類蛋白質の糖部分が吸着問題にある役割を演じていると本発明者は考えている。本発明者は電解質緩衝剤に哺乳類蛋白質の糖部分と錯体形成することができる少なくとも1つの試薬を含有させることによって上記の問題を回避した。その試薬は、効果として、蛋白質と結合してそれが毛管壁に吸収されるのを防ぎ、同時に蛋白質自体に悪影響しない保護基として作用する。

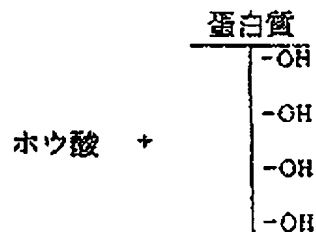
【0016】この試薬の例としてはホウ酸、例えば炭素原子数約1から約20、より好ましくは約1から約8、最も好ましくは約1のアルキル部分を有するホウ酸アルキルのようなホウ酸塩誘導体、リン酸(PO<sub>4</sub>)のアルカリ金属塩(リン酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸ルビジウム、リン酸セシウム、リン酸フランシウム)、炭素原子数約1から約8、好ましくは約1から約3、最も好ましくは1のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキルリン酸アンモニウム、炭酸(CO<sub>3</sub>)のアルカリ金属塩(炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ルビジウム、炭酸セシウム、及び炭酸フランシウム)、及び炭素原子数約1から約8、好ましくは約1から約3、最も好ましくは1のアルキル部分を有するモノー、ジー、トリー、及びテトラールアルキル炭酸アンモニウムが含まれる。本発明の最も好ましい態様においてはホウ酸が錯体形成剤である。

【0017】緩衝剤中の試薬の濃度は試薬が臨床試料中の蛋白質成分と結合するのに必要な量の過剰量存在するように選ばれる。これにより蛋白質成分の全ての糖部分が試薬によって錯体化されるのを確実にする。したがって、緩衝剤中の試薬の濃度は試料中の蛋白質濃度に対して化学量論的過剰でなければならない。好ましくは緩衝剤中の試薬の濃度は約20mMよりも大きい。ホウ酸及びホウ酸塩誘導体は好ましくは約70mMと約400mMの間、より好ましくは約75mMと約250mMの間の濃度で存在する。最も好ましいホウ酸の濃度は約80mMである。リン酸及び炭酸両方の誘導体については、約20mMから約100mMの濃度で存在させるべきである。

【0018】緩衝剤のpHは分析される試料中の実質的に全ての成分種のpI値より大きい。これにより実質的に全ての成分種が所要の実質負電荷を持つのを確実にする。臨床試料の場合、これは約8.00より大きい値、好ましくは約9.00と約12.00の間、より好ましくは約10.00と約11.00の間のpHを必要とする。最も好ましい態様では、pHは約10.25±0.10である。これらのpH値は臨床試料の実質的に全ての蛋白質種の等電点以上である。

【0019】ホウ酸は約8.0のpHにおいて糖蛋白質の糖部分と錯体を形成し、かつホウ酸は約8.0から約

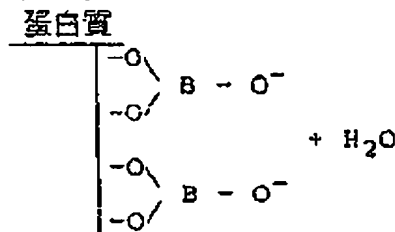
10. ①の間のpHにおいて良好な緩衝能力を持っている。すなわち、約8. ①以上のpHにおいてホウ酸は次式で図式的に示されるように糖蛋白質の糖部分と相互作用\*



\*用する。

【0020】

【化2】



【0021】この条件下で、蛋白質-ホウ酸錯体は正味の電荷を維持し、さもなければホウ酸は蛋白質に悪影響しない。イオン化によって未処理の毛管の内壁は負に荷電する。同じく負に荷電している蛋白質-ホウ酸錯体は負に荷電した内壁によって反発される。それゆえ、錯体の負に荷電した毛管内壁への吸着は阻止されるか大いに低減される。

【0022】pH調節剤は好ましくは緩衝液のpHを分析されるべき試料の成分種の等電点より高く維持するように添加される。pH調節剤は好ましくは一価のカチオンを含むものであるが、多価のカチオンは負に荷電した未処理の毛管の内壁と結合する傾向があり、そのため毛管中の電気浸透が損なわれるからである。pH調節剤の例としてはアルカリ金属の水酸化物（水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ルビジウム、水酸化セシウム、及び水酸化フランシウム）、及び炭素原子数約1から約8、好ましくは約1から約3、最も好ましくは1のアルキル部分を有するモノ-、ジ-、トリ-、及びテトラ-アルキル水酸化アンモニウムが含まれる。発明の最も好ましい態様においては、pH調節剤は水酸化ナトリウムである。

【0023】緩衝剤へ添加するpH調節剤の量は試薬を含んでなる緩衝剤のpHを試料中の成分種の等電点より高く調整及び維持するのに有効な量でなければならぬ。したがって、試薬を含んでなる緩衝剤のpHを決めることにより、研究者は緩衝剤へ添加すべきpH調節剤の量を、例えば緩衝剤のpHをpH調節剤を添加しながら監視することによって容易に決めることができる。

【0024】本発明による最も好ましい電解質緩衝剤は次のようにして調製することができる：

ホウ酸（分子量61. 83）	：	4. 95 g
水酸化ナトリウム（分子量61. 83）	：	4. 86 g
蒸留水	：	1 リットル
pH（1N・NaOHの滴加により調整）	：	10. 25 ± 0. 10

水酸化ナトリウムはホウ酸を含んでなる緩衝剤のpHを上げるため指示量を直接緩衝剤に添加することができ

る。すなわち、水酸化ナトリウムが存在しないと、ホウ酸溶液のpHは約8. ①①であり、水酸化ナトリウムの添加により約10. ①①のpHとなる。最終pHは約10. 25なるよう水酸化ナトリウムの滴加により調整することができる。

【0025】

【実施例】ここに開示した本発明の好ましい態様に従って実施例を以下に述べるが、これらの例は本発明及び請求項を限定するものではない。

#### 1. 材料及び方法

##### A. 毛管電気泳動法

臨床試料及び対照の毛管電気泳動分析はベックマン・インスツルメンツ社の高性能毛管電気泳動システム（Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA., USA, Model No. 357575）で行った。データ解析はシステム・ゴールド・ソフトウェア（System Gold<sup>®</sup> software）（ベックマン・インスツルメンツ社）により行った。前記の毛管電気泳動分析システムにはオンライン検出用に214, 254, 280及び415 nmの狭幅フィルタが内蔵されている。電気泳動は内径75 μm、長さ25 cmの熔融シリカ管（ポリミクロ・テクノロジーズ社（Polymicro Technologies, Inc., Phoenix, AZ, USA）製品番号TSP075375）中で行った。検出ウインドウはカラム出口から約6. 5 cmに位置していた。

【0026】臨床試料及び対照は上記の毛管電気泳動システムの入り口トレイ上に置いた。臨床試料及び対照は3〜10秒間に1 kVでの界面動電法により自動的に毛管中に注入された。分析はカラム電圧勾配200 V/cmを用い10分未満の時間で行われた。毛管は各運転間に洗浄及び再調整（NaOH中で18秒、蒸留水中0. 1%のトリトン-X100（Triton-X 100<sup>®</sup>）で12秒）した。

##### 【0027】B. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動（「スラブ」電気泳動）による比較血清蛋白質分析及びヘモグロビン検定分析をSPEゲルを用いるパラゴン（PARAGON<sup>®</sup>）電気泳動システム（ベックマン・インスツルメンツ社、部品No. 655905、PARAGON<sup>®</sup>はベックマン・インスツルメンツ社の商標である）により実施した。全ての操作はメーカーの指示書にしたがって行なった。

## 【0028】C. 対照及び患者からの試料

血清蛋白質の対照（コントロール）試料はベックマン・インスツルメンツ社から得た。正常の血清及び尿試料（ベックマン・インスツルメンツ社）を利用した。患者の血清、尿及び脳脊髄液はブレア・コミュニティ病院（Brea Community Hospital, Brea CA）から得た。血清試料は血清対緩衝剤1：2.0に希釈した。緩衝剤は75 mmol/lの塩化ナトリウムと20 mmol/lのリン酸カリウムを含有し、緩衝剤のpHは7.0であった。尿及び脳脊髄液試料は受け取ったままで使用した。

## 【0029】D. 電解質緩衝剤

すべての薬品は少なくともACS級であった。電解質緩衝剤は4.95gのホウ酸（分子量61.83）及び4.86gの水酸化ナトリウム（分子量40.00）を蒸留水H<sub>2</sub>Oに溶解した。ホウ酸の最終濃度は80 mM/lで水酸化ナトリウムの最終濃度は121.6 mM/lであった。毛管洗浄液及び再コンディショニング溶液は上記した通りであった。

## 【0030】II. 実施例

## 例1 正常な対照血清のスラブ電気泳動分析

前述の正常な対照血清を前述のパラゴン・ゲル電気泳動システムによりSPEゲルによって分析し、図2の電気泳動グラフを得た。

## 【0031】例2 正常な対照血清のCZE

例1で用いた対照を前述のベックマン毛管ゾーン電気泳動システムを用い、214 nmでの検出、5 kVの電圧下で分析した。分析結果は10分間未満の時間で得られた。分析により図1に示す電気泳動グラフが得られた。

## 【0032】例3 血清試料-IgGカップパ骨髓腫-ス

ラブ電気泳動分析

IgGカップパ骨髓腫患者からの血清試料の例1に記載したのと同じ条件を用いた分析で図3に示す電気泳動グラフが得られた。

## 【0033】例4 血清試料-IgGカップパ骨髓腫-CZE

IgGカップパ骨髓腫患者からの血清試料を例2に記載したのと同じ条件を用い分析した。分析により図4に示す電気泳動グラフが得られた。

## 【0034】例5 脳脊髄液試料CZE

患者脳脊髄液試料を例2に記載したのと同じ条件を用い分析した。分析により図5に示す電気泳動グラフが得られた。

## 【0035】例6 脳脊髄液試料CZE

同じ患者脳脊髄液試料を14 kDルトン・カットオフの分子量で透析し、例2に記載したのと同じ条件を用い分析した。分析により図6に示す電気泳動グラフが得られた。

## 【0036】例7 正常な尿試料CZE

正常な患者例2に記載した条件を用い分析した。分析に

より図7の電気泳動グラフが得られた。

## 【0037】例8 尿試料-ベンス・ジョーンズ蛋白質-CZE

ベンス・ジョーンズ蛋白質を含む患者尿試料を例7に記載した条件を用い分析した。分析により図8の電気泳動グラフが得られた。

## 【0038】例9 CZE再現性

例2に記載した条件と試料を用いCZE分析の再現性研究を行い、図9に示す結果を得た。電気泳動グラフAは試料の1回目の運転であり、電気泳動グラフBは試料の20回目の運転の結果である。

【0039】上記のデータは未処理毛管中の臨床試料の毛管ゾーン電気移動分析がここに開示の電解質緩衝剤を利用して行えることを実証している。同じ試料のCZE及び従来のスラブ電気泳動を用いた比較試験は結果が殆ど同じパターンとなることを示している。さらに、例9に記載したデータは、20回の繰り返し運転後のピークの溶出時間の変化が10秒未満であり、このシステムの優れた再現性を示している。このように、上記のデータは未処理毛管中の臨床試料CZE分析からもたらされる利点と便益を実証している。

【0040】前述の標準及び方法は相当詳細にかつ好ましい態様に基いて説明したものであるが、これらは本開示を何等限定しようとするものではない。本発明はここに述べたベックマン高性能毛管電気泳動システムに限定されるものではない。この技術分野の範囲内でなされる修正及び変化は本発明の請求範囲内に相当するものである。

## 【0041】

【発明の効果】本発明によれば、蛋白質含有試料、特に臨床試料の各成分種を毛管電気泳動により正確かつ迅速に再現性よく定量することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】正常な対照血清試料のCZEによる成分分離の電気泳動グラフである。

【図2】図1の正常な対照血清試料のスラブ電気泳動による成分分離の電気泳動グラフである。

【図3】IgGカップパ骨髓腫患者血清試料のスラブ電気泳動による成分分離の電気泳動グラフである。

【図4】図3のIgGカップパ骨髓腫患者血清試料のCZEによる成分分離の電気泳動グラフである。

【図5】脳脊髄液試料のCZEによる成分分離の電気泳動グラフである。

【図6】図5と同じ脳脊髄液試料の14 kDルトン・カットオフの分子量で透析したもののCZEによる成分分離の電気泳動グラフである。

【図7】正常な尿試料のCZEによる成分分離の電気泳動グラフである。

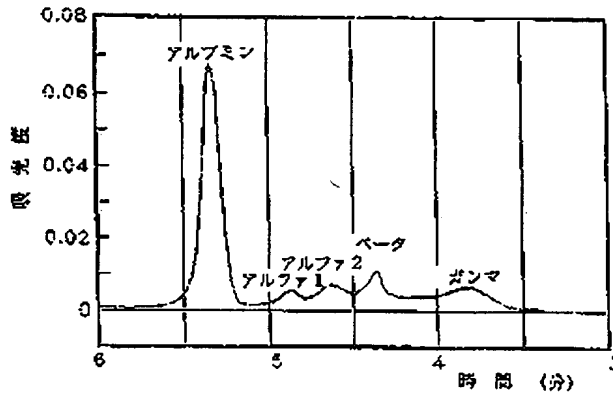
【図8】ベンス・ジョーンズ蛋白質を含む患者尿試料のCZEによる成分分離の電気泳動グラフである。



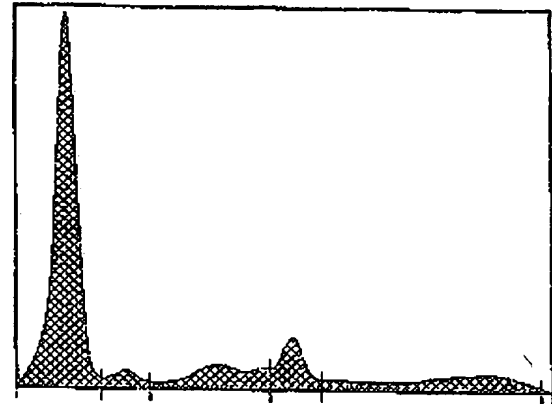
【図9】 正常な血清蛋白質をC2Eにより成分分離した電気泳動グラフを2つ重ねたもので、そのうち電気泳動\*

\* グラフAは1回目の運転、電気泳動グラフBは2回目の運転結果である。

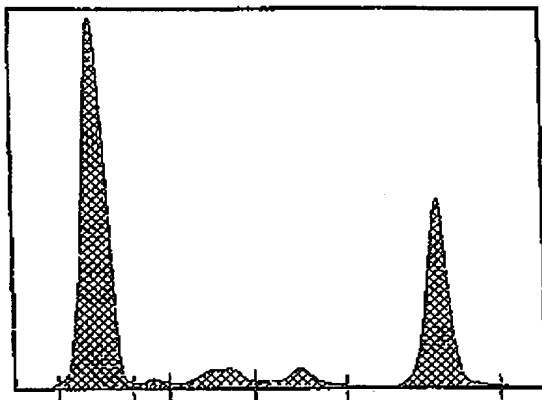
【図1】



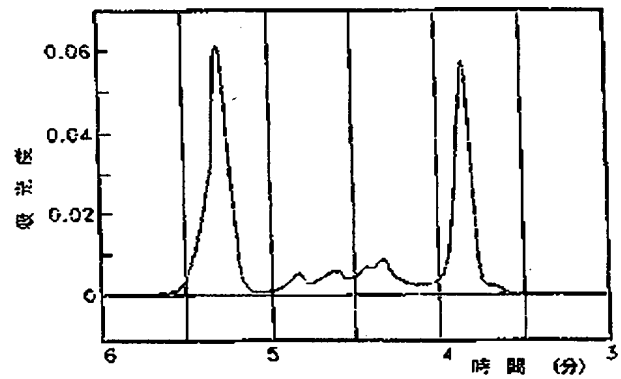
【図2】



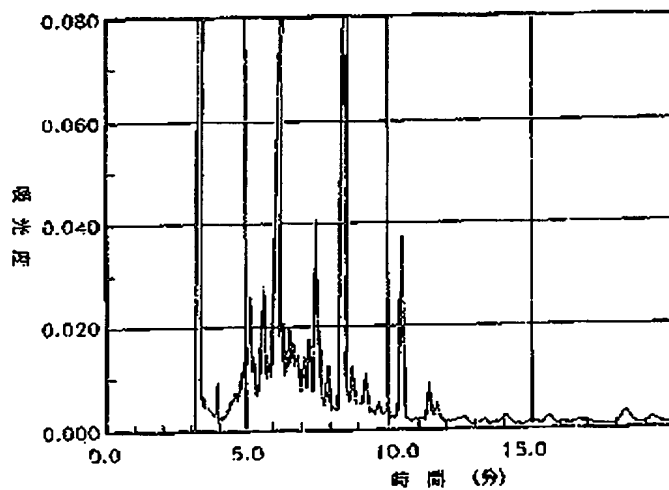
【図3】



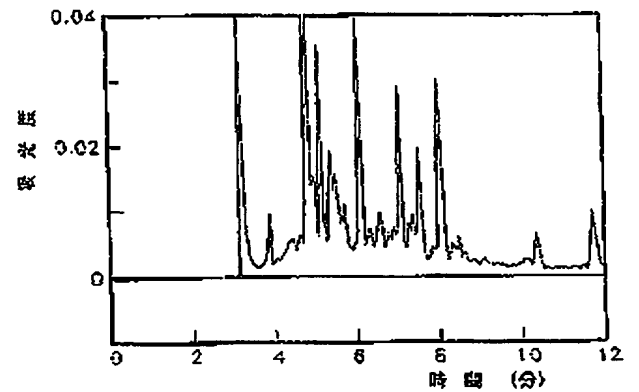
【図4】



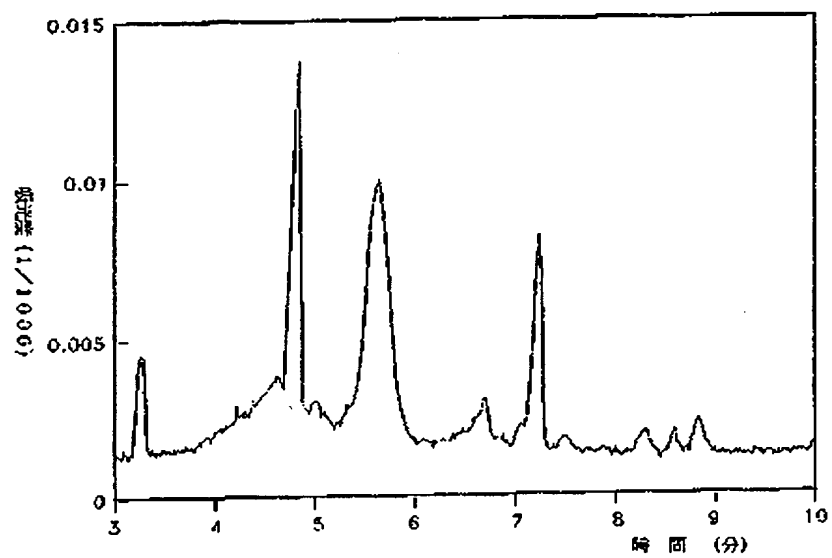
【図7】



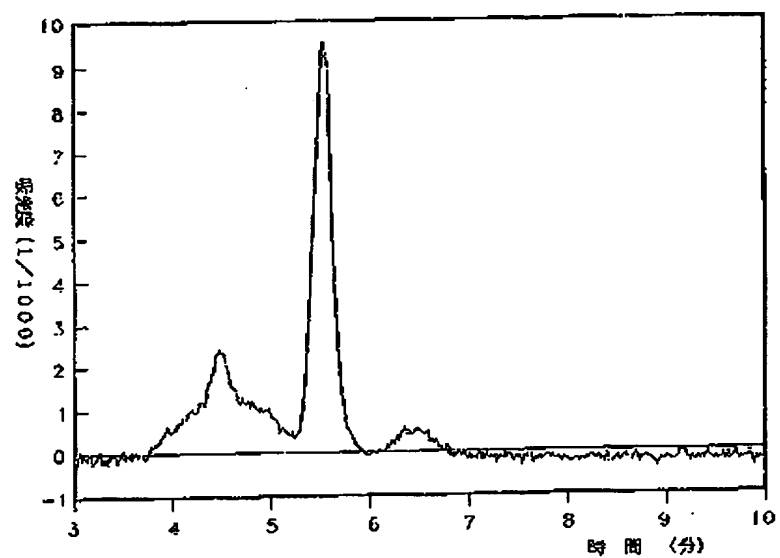
【図8】



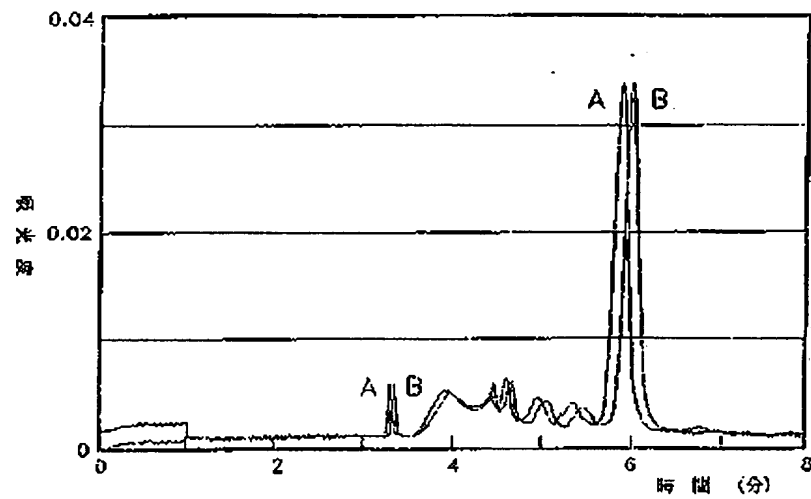
【図5】



【図6】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 ジェイムズ シー スターンバーグ  
アメリカ合衆国 92635 カリフォルニア  
州 フラートン カタリナ ロード 201